

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390443
 研究課題名（和文）舌下免疫－粘膜ワクチンの新たな投与経路としての有用性に関する研究
 研究課題名（英文）Sublingual immunization – A new vaccination route for mucosa immunity and protection of upper respiratory infection

研究代表者
 黒野 祐一（KURONO YUICHI）
 鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：80153427

研究成果の概要（和文）：舌下ワクチンの上気道感染症予防に対する効果と安全性を検討することを目的として、細菌の菌体成分であるホスホリルコリン（PC）をマウスに舌下投与し、その粘膜免疫応答を観察した。その結果、PCを舌下投与することで経鼻投与と同等の粘膜および全身免疫応答が誘導され、細菌の鼻腔からのクリアランスを亢進し、舌下免疫の感染予防効果が示された。さらに、舌下ワクチンはI型アレルギー反応を抑制することが証明された。

研究成果の概要（英文）：In order to investigate the effectiveness and safety of sublingual vaccine for protecting upper respiratory infection, phosphorylcholine (PC) was sublingually administered to mice and mucosal immune responses were examined. The results showed that sublingual immunization with PC induced mucosal and systemic immune responses as strong as intranasal immunization and increased bacterial clearance from nose, indicating the immune-protective effectiveness of sublingual vaccine. Further, it was demonstrated that sublingual vaccine reduced type I allergic reaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：1) 粘膜免疫 2) 舌下免疫 3) ワクチン 4) IgA 5) ホスホリルコリン
 6) 上気道感染 7) インフルエンザ菌 8) 肺炎球菌

1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎など上気道感染症は、今日においてもなおその発症頻度は高い。また、抗菌薬の不適切な投与に起因するペニシリン耐性肺炎球菌をはじめ、様々な多剤耐性菌の急増が大きな問題となっている。したがって、

上気道感染症を予防するためのワクチン開発が急務とされ、さらに、抗菌薬の使用を抑制することでの医療経済における効果も大きいと期待される。

そこで、我々はそのワクチン開発を目指し

て基礎的研究を重ね、(1) 上気道感染症の発症には、粘膜表面に細菌が付着することが重要であり、外分泌液中に含まれる分泌型 IgA がこれを阻止すること。(2) 分泌型 IgA の産生は、抗原を経粘膜的に投与し粘膜免疫を賦活することで亢進すること。(3) 鼻腔や中耳腔など上気道の粘膜免疫応答は、抗原の経鼻的投与が経口投与あるいは経気管支投与よりも優れ、それにより細菌のクリアランスが亢進すること。(4) ホスホリルコリン (PC) は肺炎球菌などのグラム陽性菌およびインフルエンザ菌などのグラム陰性菌のすべての細菌の外膜に存在し、ハプテンあるいはアジュバントとともに経鼻投与することで、PC 特異的粘膜免疫応答を誘導できることを報告してきた。

また、最近、我々は、急性感染症において PC に対する特異的抗体価が上昇することを確認しており、PC がヒトにおいても免疫原性を有し、これに対する免疫応答が生体防御に有効であることを明らかにしている。これらの研究結果から、上気道感染症の予防に経鼻ワクチンが有効であり、PC が広域スペクトラムを持つ、実用性の高いワクチンのひとつになりうると考えられる。

ところが、経鼻ワクチンが嗅粘膜を介して中枢に吸収されて何らかの神経障害をもたらすこと、あるいは、Th2 型の反応を誘導し、喘息など下気道のアレルギー性疾患を誘発するなど、経鼻ワクチンに対する問題点が指摘されている。

したがって、粘膜ワクチンの実用化に向けて、経鼻免疫以外の上気道粘膜免疫応答を誘導できるルートを模索することが重要な課題となっている。その一つが舌下免疫であり、この免疫ルートは、アレルギーの領域ですでに花粉症に対する治療として臨床応用されている。しかし、上気道感染症に対する粘膜

ワクチンの投与ルートとしての研究は未だなされていない。また、花粉症に対して臨床効果が証明されているものの、その作用機序については全く不明である。すなわち、舌下免疫は感染症においてもアレルギーにおいても未知なる領域と言える。

2. 研究の目的

本研究では、舌下ワクチンの上気道感染症に対する有用性と可能性を探るため、マウスそしてヒト組織材料を用いて以下の事項を明らかにすることを目的とした。

(1) 舌下免疫によって粘膜免疫応答が誘導できるか？

(2) 舌下免疫と経鼻免疫とでその免疫応答とに相違点があるか？

(3) 舌下免疫における粘膜免疫誘導組織は何か？

(4) PC が舌下免疫応答の免疫原となりうるか？

(5) PC の舌下免疫によって I 型アレルギーが誘導されないか？

3. 研究の方法

(1) 舌下粘膜免疫応答の誘導

マウスをケタミン腹腔内注射で麻酔後、上下顎間にバーを挿入し開口させ、コレラトキシン (CT) あるいは PC (PC-KLH) を投与し、そのまま 5 分間保持した。これを週 1 回、3 週連続投与し、最終免疫 7 日後に、血液、および唾液、鼻洗浄液、糞便、膣洗浄液などの外分泌液検体を採取した。さらに、マウスを頸部脱臼によって屠殺し、鼻粘膜、脾臓を採取した。これらの検体を用いて、抗原特異的免疫グロブリン活性および抗体産生細胞数を、ELISA、ELISPOT で定量した。

また、免疫後に鼻腔へ肺炎球菌およびインフルエンザ菌の生菌を接種し、鼻腔からのクリアランスを観察した。

(2) 抗原投与経路による免疫応答の相違

舌下免疫の特異性と抗原投与部位による粘膜免疫応答の相違を観察するため、舌下免疫と同一の抗原を経鼻そして腹腔内投与し、その免疫応答を舌下免疫と比較した。抗原投与量は経鼻免疫は舌下免疫と同じく 10 μ g、腹腔内投与では 50 μ g を投与した。

(3) 舌下免疫による I 型アレルギー反応

粘膜免疫は I 型アレルギーと同じく Th2 型の免疫応答をもたらすため、副反応として IgE 抗体産生によるアナフィラキシーの発症が懸念される。そこで、CT 単独あるいは CT と PC をともに週 1 回、3 週 (3 回) 舌下あるいは経鼻投与し、最終免疫終了後 7 日目に採血し、血清中の総 IgE 抗体量を測定した。さらに、脾臓からリンパ球を分離し、マイクロビーズ細胞分離法を用いて CD4 陽性 T 細胞を分離し、マイトマイシン処理した抗原提示細胞および抗原とともに 48 時間培養し、培養上清中の IFN- γ 、IL-4 を ELISA で定量した。

(4) 肺炎球菌における PC 発現と病原性

肺炎球菌を液体培地で培養し、経時的な PC の発現量を ELISA 法で観察した。また、ヒト咽頭細胞株を 2 本鎖 RNA の Poly(I:C) で刺激し、PC の受容体となる PAF 受容体 (PAF-R) の発現を FACS で解析した。さらに、PAF-R の発現と肺炎球菌の培養細胞への接着を定量化し、細菌接着への PC の関与を検討した。

(5) IgA 腎症口蓋扁桃における PC 特異的免疫応答

PC は細菌のみならずヒト細胞の構成因子でもあり、これをワクチンとして用いた際に、自己免疫応答を誘導することが懸念される。事実、IgA 腎症の動物モデル作成に PC が使用されている。そこで、ヒト口蓋扁桃におけ

る PC 特異的抗体産生の有無、そして IgA 腎症への PC の関与を検討するため、口蓋扁桃摘出によって得られた扁桃組織からリンパ球を分離し、ELISPOT によって、PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数を定量した。そして、その結果と IgA 腎症の重症度および術後経過を比較した。

4. 研究成果

(1) 舌下粘膜免疫応答の誘導

PC-KLH 単独の舌下免疫では全身そして粘膜免疫応答も誘導できなかったため、粘膜アジュバントとして CT とともにマウスに舌下投与した。その結果、唾液、鼻洗浄液、膣洗浄液のすべての外分泌液中、そして血清中にも PC 特異的 IgG、IgM、IgA 応答が誘導された。また、鼻粘膜、脾臓から分離されたリンパ球の ELISPOT でも、PC 特異的免疫応答の誘導が確認された。

さらに、免疫終了後、マウス鼻腔へ肺炎球菌あるいはインフルエンザ菌を接種したところ、非免疫群と比較して PC 舌下免疫群ではいずれの細菌も有意に早く鼻腔から排除された。すなわち、舌下ワクチンによって細菌のクリアランスが亢進し、細菌感染が予防できることが示された。

(2) 抗原投与経路による免疫応答の相違

PC 経鼻免疫と舌下免疫とを比較すると、その血清 IgG そして唾液および鼻洗浄液中の IgA 応答は同レベルであった。しかし、興味深いことに、膣洗浄液中の IgA 応答は舌下免疫のほうが経鼻免疫よりも高値であった。このことは、舌下免疫と経鼻免疫の粘膜応答機序が異なることを示唆していると思われる。

(3) 舌下免疫による I 型アレルギー反応

CT を抗原として舌下あるいは経鼻投与した

ところ、舌下投与は経鼻投与と比較して有意にその値が低値であった。さらに、CTをPCとともに舌下あるいは経鼻投与すると、両者はともにCT単独投与よりも血清中IgEが低値となり、PCがIgE産生を抑制することが示唆された。

そこで、CT単独あるいはCTをPCとともに舌下投与し、最終免疫終了後7日目に脾臓を採取し、脾臓CD4陽性T細胞からのサイトカイン産生をみると、CT単独群と比較してCT+PC群ではIL-4産生が少なく、IFN- γ の産生が増加していた。すなわち、PCがTh1型の免疫応答を誘導することが示された。

(4) 肺炎球菌におけるPC発現と病原性

肺炎球菌を培養し培養時間とPCの発現をみると、Log相においてPCの発現量が増加した。そして、PCを高発現する肺炎球菌のほうが低発現の細菌よりも咽頭上皮への接着性が高かった。また、咽頭上皮細胞をPoly(I:C)で刺激するとPAF-Rが発現し、その発現の強度が増すことによって肺炎球菌の接着性も増強した。以上の結果から、PCそしてPAF-Rの発現が肺炎球菌の接着さらには感染の発症に関与すること、そして、PCに対する特異的免疫応答が感染予防に有用なことが確認された。

(5) IgA腎症口蓋扁桃におけるPC特異的免疫応答

口蓋扁桃にはその数は少数であるがPC特異的抗体産生細胞が認められた。そのアイソタイプを比較すると、PC特異的IgMおよびIgG産生細胞数は慢性扁桃炎および扁桃周囲膿瘍がIgA腎症より高値であった。一方、PC特異的IgA産生細胞数はIgA腎症でむしろ高値であった。さらに、IgA腎症では、PC特異的IgA産生細胞数が多い症例のほうが術後経

過が良好な傾向が認められた。これらの結果から、口蓋扁桃におけるPC特異的IgA応答がIgA腎症の病態に関与することが推測された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

1. K. Sekiyama, Y. Kurono: The role of vascular endothelial growth factor in pediatric otitis media with effusion. *Auris Nasus Larynx* 2011;38 319-324 (査読有)
2. 黒野祐一: 鼻咽腔関連リンパ組織. 炎症と免疫 2010; 18 (5) 557-559. (査読無)
3. 黒野祐一: 小児期における扁桃の役割と扁桃摘出術の適応
小児耳鼻咽喉科 2009 ; 30(3) 196-199
(査読無)
4. 黒野祐一: 上気道一下気道一連関呼吸 2009;28(6) 579-584 (査読無)
5. Fukuiwa T, Sekine S, Kobayashi R, Suzuki H, Kataoka K, Gilbert RS, Kurono Y, Boyaka PN, Krieg AM, McGhee JR, Fujihashi K. A combination of Flt3 ligand cDNA and CpG ODN as nasal adjuvant elicits NALT dendritic cells for prolonged mucosal immunity. *Vaccine*. 2008; 26: 4849-4859. (査読有)
6. Song JH, Nguyen HH, Cuburu N, Horimoto T, Ko SY, Park SH, Czerkinsky C, Kweon MN. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:1644-1649. (査読有)
7. 黒野祐一, 田中紀充, 福岩達哉, 宮下圭一,

- 早水佳子：上気道炎症とワクチン療法。
日耳鼻 2008; 111: 689-694. (査読有)
8. 川島雅樹, 田中紀充, 黒野祐一：肺炎球菌
インフルエンザ菌の気道上皮接着における
phosphorylcholine の役割. *Bacterial Adherence
& Biofilm* 2008; 22: 71-74. (査読有)
9. 黒野祐一, 田中紀充：上気道炎症とワクチ
ン療法 日耳鼻 2008;111:689-694
(査読有)
10. 福岩達也, 黒野祐一：免疫賦活のための
アジュバント 耳鼻咽喉科展望
2008;51(補 1):39-42 (査読無)
- [学会発表] (計 15 件)
1. Yuichi Kurono: Mucosal immunology and its
application for preventing upper respiratory
infection. 13th Korea-Japan Otolaryngology
Joint Congress (Seoul, Korea) 2010年9月
10日
2. Yuichi Kurono: The diversity of mucosal
immune responses in upper respiratory organs
and its application for mucosal vaccine. 7th
International Symposium on Tonsils and
Mucosal Barriers of the Upper Airway.
(旭川市) 2010年7月8日
3. Norimitu Tanaka, Yuichi Kurono et al :
Sublingual immunization with
phosphorylcholine has a potential of broad
spectrum vaccine against upper airway
infections. 14th International Congress of
Mucosal Immunology (Boston,USA) 2009
年7月8日
4. 川島雅樹, 田中紀充, 黒野祐一：肺炎球菌/
インフルエンザ菌の気道上皮接着における
phosphorylcholine の関与 第110回日本耳
鼻咽喉科学会総会 (東京都) 2009年5
月15日
5. Yuichi Kurono: Application of mucosal vaccine
for preventing otitis media. 6th Extraordinary
Symposium on Recent Advances in Otitis
Media (Seoul, Korea) 2009年5月7日
6. Norimitu Tanaka, Yuichi Kurono et al:
Mucosal and systemic immune responses
induced by sublingual immunization with
phosphorylcholine. 6th Extraordinary
Symposium on Recent Advances in Otitis
Media (Seoul, Korea) 2009年5月7日
7. Yoshiko Hayamizu, Norimitu Tanaka, Yuichi
Kurono et al : Sublingual immunization with
phosphorylcholine induces antigen specific
mucosal and systemic immune responses in
mice. Seven Department Joint Meeting of
Otolaryngology (淡路市) 2009年3月28
日
8. 田中紀充, 黒野祐一：Phosphorylcholine(PC)
経鼻・舌下投与における免疫応答の相違点
第27回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
(千葉市) 2009年2月13日
9. 黒野祐一：上気道感染症と粘膜免疫。
第33回東日本小児科学会 (横浜) 2008年
11月23日
10. 田中紀充, 黒野祐一：中耳炎予防を目的とし
た Phosphorylcholine 舌下ワクチンにおける
粘膜免疫応答の観察 第18回日本耳科学会

総会 (神戸市) 2008年10月17日

11. 田中紀充,黒野祐一: 上気道感染症に対する舌下粘膜ワクチンの有用性 第21回日本口腔・咽喉科学会 (鹿児島市) 2008年9月12日
12. 川島雅樹,田中紀充,黒野祐一: 気道上皮細菌付着における Phosphorylcoline の関与 第38回日本耳鼻咽喉科感染症研究会 第32回エアロゾル研究会 (松江市) 2008年9月6日
13. 黒野祐一: 上気道炎症とワクチン療法 第109回日本耳鼻咽喉科学会総会 (大阪市) 2008年5月16日
14. 田中紀充,黒野祐一: 抗原舌下投与による鼻粘膜抗原特異的粘膜免疫応答 第109回日本耳鼻咽喉科学会総会 (大阪市) 2008年5月16日
15. 川島雅樹,田中紀充,黒野祐一: インフルエンザ菌の気道上皮接着と Phosphorylcoline の関連性について 第109回日本耳鼻咽喉科学会総会 (大阪市) 2008年5月16日

[図書] (計1件)

1. 清野 宏 (編集) 黒野祐一 (分担)
シナジー (株) 臨床粘膜免疫学 -扁桃-
2010年 431-436

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒野 祐一 (KURONO YUICHI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 80153427

(2) 研究分担者

松根 彰志 (MATSUNE SHOJI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 00253899

吉福 孝介 (YOSHIFUKU KOSUKE)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 70381168

田中 紀充 (TANAKA NORIMITSU)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 90404483

大堀 純一郎 (OHORI JUNICHIRO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 90507162

牧瀬 高穂 (MAKISE TAKAO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号: 30585120

(3) 連携研究者

Mi-Na Kweon
Mucosal Immunology Section, International
Vaccine Institute, Seoul